

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-157267

(P2000-157267A)

(43)公開日 平成12年6月13日(2000.6.13)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
1/21		1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/12		C 1 2 P 13/12	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21			
C 1 2 R 1:19)			

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平10-333131

(22)出願日 平成10年11月24日(1998.11.24)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年9月30日  
 社団法人日本生物工学会開催の「平成10年度日本生物工  
 学会大会」において文書をもって発表

(71)出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 中森 茂

福井県吉田郡松岡町兼定島38-7 B103

(72)発明者 高木 博史

福井県福井市志比口2丁目21-26-602

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA71 CA02 CA06

DA06 CA25 HA01 HA03

4B064 AE16 CA02 CC24 DA01

4B065 AA26X AA26Y AC14 BA18

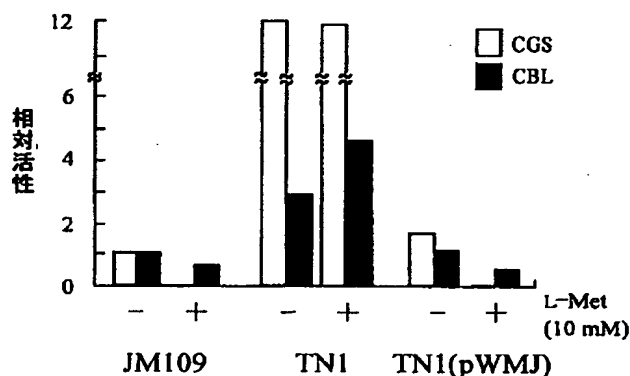
CA17 CA44

(54)【発明の名称】 変異型met J遺伝子及びL-メチオニンの製造法

## (57)【要約】

【課題】 L-メチオニン生産能を有する微生物を育種し、同微生物を用いて発酵法によりL-メチオニンを製造する。

【解決手段】 配列番号3に示すアミノ酸配列を有し、かつ5番目のアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基に置換されたL-メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子を持つ微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造する。



BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示すエシェリヒア・コリ由来のL-メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子。

(A) 配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、かつ、55番目のアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基であるタンパク質。

(B) 配列番号4において、55番目のアミノ酸残基以外の位置の1又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、配列番号4に示すアミノ酸配列の55番目のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基であり、かつ、メチオニン生合成を抑制する活性が低下したタンパク質。

【請求項2】 前記セリン残基以外のアミノ酸残基がアスパラギン残基である請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 染色体上のL-メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子が請求項1又は2に記載の遺伝子である微生物。

【請求項4】 エシェリヒア属細菌である請求項3記載の微生物。

【請求項5】 請求項3又は4に記載の微生物を培地に培養し、培地中にL-メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするL-メチオニンの製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エシェリヒア・コリ由来のL-メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする変異型遺伝子、同DNAを保持する微生物、及びL-メチオニンの製造法に関する。L-メチオニンは、医薬等として重要なアミノ酸である。

## 【0002】

【従来の技術】メチオニンは、工業的には化学合成により製造されるDL体が中心となっている。L体が必要な場合は、このDL体をアセチル化してN-アセチル-L-メチオニンとし、酵素的にL体だけを脱アセチル化することによって製造される。

【0003】一方、発酵法によるL-メチオニンの製造については、L-メチオニンアナログ耐性変異株を用いる方法が報告されているが、生産量は少なく、またL-メチオニン生産に影響を与える因子は明らかではないため、最も発酵生産が困難なアミノ酸の一つである。例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli* (E. coli)) K-12株を用いる方法が、公開特許公報昭56-35992あるいは文献 (Chattapadhyay, M. K. et al., Med. Sci. Res. 23, 775 (1995)、Chattapadhyay, M. K. et al., Biotechnol. Lett. 17, 567-570 (1995)) に報告されているが、いずれもL-メチオニンの生産量は工業的に用いるには不十分であった。

【0004】L-メチオニンの直接発酵法が困難である理由として、生合成経路の複雑さと、強い代謝調節が原因として考えられている。ほとんどの微生物では、L-メチオニンの生合成は他のアミノ酸に比較して厳格に制御されている。エシェリヒア・コリにおいては、L-メチオニンの生合成経路は、L-スレオニンの生合成経路と一部共通であり、L-ホモセリンが共通の中間体となっている。L-ホモセリンからL-メチオニンへの固有経路の第一段階は、metKによりコードされるホモセリントランスサクシニラーゼによって触媒されるが、同酵素は最終生産物であるL-メチオニンとL-メチオニンの代謝物であるS-アデノシルメチオニンにより協奏的な阻害を受けることが知られている (Lee, L.-W. et al., J. Biol. Chem. 241, 5479-5480 (1966))。このホモセリントランスサクシニラーゼによる反応以降のL-メチオニンの固有生合成経路の酵素遺伝子の発現は、リプレッサーであるMetJタンパク質による抑制を受けることが明らかとなっている (Greene, R. C., Biosynthesis of Methionine in "Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology/Second Edition", ed. Neidhardt, F. D., ASM Press, pp. 542-560 (1996) )。また、この抑制には、S-アデノシルメチオニンがコリプレッサーとして働いている。

【0005】上記のように、L-メチオニン生合成の調節は、ホモセリントランスサクシニラーゼのフィードバック阻害と生合成系遺伝子の発現抑制によって行われている。従来の研究から、L-メチオニンアナログ耐性株は、上記調節が解除されることで耐性を獲得できることが明らかにされており、それらの耐性に関与する変異遺伝子としてmetJ変異及びmetK変異が知られている。そして、metJ変異はリプレッサーとしての機能を失ったものであり、metK変異はコリプレッサーであり協奏阻害因子でもあるS-アデノシルメチオニンの合成能が低下したものであると考えられている。また、エシェリヒア・コリでは、野生型metJ遺伝子及び変異型metJ遺伝子の構造及び機能の解析に関する研究もなされている (Liljestr and-Golden, C.A. et al., J. Bacteriol., 157, 413-419 (1984), Rafferty, J.B. et al., Nature, 341, 705-710 (1989), Saint-Girons, I. et al., J. Biol. Chem., 259, 14282-14285 (1984), Adelberg, E.D., J. Bacteriol., 76, 326 (1958), Bala, G.A. et al., J. Bacteriol., 171, 4095-4099 (1989))。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記のように、L-メチオニン生合成に関与する酵素やその遺伝子について、ある程度の研究はなされているが、L-メチオニンの発酵生産に直接結びつく知見はほとんど得られておらず、MetJタンパク質の活性とL-メチオニン生産能との関係については関心が払われていない。

【0007】本発明は、上記現状に鑑みなされたもので

あり、Ｌ－メチオニン生産に影響を与える因子を明らかにしてＬ－メチオニン生産菌を育種し、発酵法によるＬ－メチオニンの生産を可能とすることを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ね、多数のＬ－メチオニンアナログ耐性株の中からＬ－メチオニン生産能を有する変異株を単離することに成功し、それらの変異株が*metJ*遺伝子の特定の部位に変異を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0009】(1) 下記(A)又は(B)に示すエシェリヒア・コリ由来のＬ－メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子。

(A) 配列番号4に示すアミノ酸配列を有し、かつ、55番目のアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基であるタンパク質。

(B) 配列番号4において、55番目のアミノ酸残基以外の位置の1又は複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、配列番号4に示すアミノ酸配列の55番目のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基であり、かつ、メチオニン生合成を抑制する活性が低下したタンパク質。

【0010】(2) 前記セリン残基以外のアミノ酸残基がアスパラギン残基である(1)の遺伝子。

【0011】(3) 染色体上のＬ－メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子が(1)又は(2)に記載の遺伝子である微生物。

(4) エシェリヒア属細菌である(3)の微生物。

【0012】(5) 前記(3)又は(4)の微生物を培地に培養し、培地中にＬ－メチオニンを生成蓄積せしめ、これを該培地から採取することを特徴とするＬ－メチオニンの製造法。

【0013】本発明において「Ｌ－メチオニン生産能」とは、微生物を培地に培養したときに、培地中にＬ－メチオニンを蓄積する能力をいう。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のDNAは、エシェリヒア・コリ由来のＬ－メチオニン生合成系のリプレッサータンパク質をコードする遺伝子(*metJ*)において、コードされるタンパク質の55番目のアミノ酸残基がセリン残基以外のアミノ酸残基に変異したDNA(以下、「変異型*metJ*遺伝子」ともいう)である。ここで「55番目」とは、*metJ*遺伝子の開始コドンによってコードされるメチオニンを含めて数えたときの位置をいう。通常、タンパク質が翻訳された後に、N末端のメチオニン又はフォルミルメチオニンは除去されることが多いが、このメチオニン又はフォルミルメチオニンを除いて数えた場合は、前記セリン残基は5

4番目のアミノ酸残基である。

【0015】本発明のDNAは、後記実施例に示すように、エシェリヒア・コリのＬ－メチオニンアナログ耐性株の中からＬ－メチオニン生産能を有する変異株を選択し、同変異株から*metJ*遺伝子を単離し、その構造を明らかにすることによって取得されたものである。

【0016】具体的には、N－メチル－N’－ニトロ－N－ニトロソグアニジン(NTG)を用いて変異処理したエシェリヒア・コリJM109株から、1mg/ml、3mg/ml又は5mg/mlのDL－エチオニン又はDL－ノルロイシンを含む最少培地プレートで生育する変異株を選択し、それらの変異株から、ペディオコッカス・アシディラクティシ(ロイコノストック・メセンテロイデス)IFO3076株を用いたマイクロバイオアッセイ(Tsunoda, T. et al., Amino Acids, 3, 7-13 (1961) 参照)により、Ｌ－メチオニン生産能を有する変異株を選択した。その結果、約4500株のエチオニン耐性株から1株、約1000株のノルロイシン耐性株から3株、Ｌ－メチオニン生産能を有する変異株が得られた。

【0017】これらの4株の変異株から*metJ*遺伝子を単離し、それらの塩基配列を決定したところ、意外なことに、いずれもコード領域の164番目の塩基がGからAに置換されていた。この塩基置換により、コードされるアミノ酸配列は、野生株ではセリン残基である55番目のアミノ酸残基がアスパラギン残基に置換される。この変異型*metJ*遺伝子の塩基配列を配列番号3に示す。また、この塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0018】Ｌ－メチオニン生産能を有する変異株は、上記のようにＬ－メチオニンアナログとして2種類の化合物を用いて独立に得られた菌株であるので、それぞれの変異は異なるものであると当初は考えられたが、いずれも同一の変異によるものであったことから、*metJ*遺伝子の上記変異点はＬ－メチオニン生産に重要であることが示唆された。

【0019】本発明のDNAは、上記のようにアナログ耐性変異株から取得されたものであるが、本発明により、Ｌ－メチオニン生産に有効な変異型*metJ*遺伝子の変異の位置が明らかとなったので、野生株から野生型*metJ*遺伝子を単離し、同遺伝子に部位特異的変異法(Kramer, W. and Frits, H. J., Methods in Enzymology, 15, 4, 350 (1987))によって所定の変異を導入することによっても、変異型*metJ*遺伝子を取得することができる。すなわち、野生型*metJ*遺伝子では、配列番号4に示すアミノ酸配列において、55番目のコドンはセリン残基をコードしているが、これを、セリン残基以外のアミノ酸残基をコードするコドンに置換すればよい。セリン以外のアミノ酸残基としては、55番目のセリン残基をそのアミノ酸残基に変化させたときに、該変異を有する*metJ*遺伝子を保持する微生物がＬ－メチオニン生産能を有する

ものであれば特に制限されないが、好ましくは、塩基性アミノ酸残基、より好ましくはアスパラギン残基が挙げられる。

【0020】本発明の遺伝子は、配列番号3に示す塩基配列を有するDNAの他に、配列番号4に示すアミノ酸配列をコードするDNA、及び配列番号4に示すアミノ酸配列において、55番目のアスパラギン残基が、セリンを除く他のアミノ酸残基に変化した配列をコードするDNAを含む。また、上記DNAに、配列番号4に記載のアミノ酸配列における55番目のアミノ酸残基以外の位置において、1若しくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を生じる変異が加わっても、コードされるタンパク質のメチオニン生成を抑制する活性が低下し、その結果、同DNAを保持する微生物がL-メチオニン生産能を有するものであれば、そのようなDNAは本発明の遺伝子に含まれる。導入される変異の数は、タンパク質の立体構造における変異アミノ酸の位置や種類によっても異なり、L-メチオニン生成を抑制する活性が低下するものである限り特に制限されないが、通常、1〜20個、好ましくは1〜10個である。

【0021】metJ遺伝子のクローニング等に用いるベクターとしては、例えばエシェリヒア・コリ細胞内で自律複製可能なプラスミド、具体的にはpUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010等が挙げられる。

【0022】本発明の変異型metJ遺伝子の一例として、配列表配列番号3に示す塩基配列を有するDNAは、同遺伝子を保持するエシェリヒア・コリTN1株(AJ13543)の染色体DNAから、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとするポリマーゼチェーンリアクション法(PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)参照)により単離することができる。TN1株(AJ13543)は、1998年11月24日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-17060として寄託されている。

【0023】染色体上のL-メチオニン生成系のリプレッサタンパク質をコードする遺伝子が上記変異型metJ遺伝子である微生物(以下、「本発明の微生物」ともいう)は、L-メチオニン生産株として、又はL-メチオニン生産株を育種する出発材料として利用することができる。本発明の微生物としては、metJ遺伝子がMetJタンパク質の55番目のアミノ酸残基がセリン以外のアミノ酸残基に置換されるような変異を有する変異株であってもよいし、変異型metJ遺伝子が導入されたものであってもよい。前記変異株としては、実施例に示すエシェリヒア・コリTN1株(FERM P-17060)が挙げられる。

【0024】変異型metJ遺伝子を保持していても、野生型metJ遺伝子を発現可能な形態で保持する微生物は、野

生型metJ遺伝子が変異型metJ遺伝子に対して優性に作用するために、変異型metJ遺伝子の効果が期待できない。したがって、本発明の微生物としては、野生型metJ遺伝子が正常に機能せず、かつ、変異型metJ遺伝子を保持することが好ましい。このような微生物は、metJ遺伝子が正常に機能しない変異株に、変異型metJ遺伝子を保持する組換えプラスミドを導入することによって得られる。metJ遺伝子が正常に機能しない変異株は、例えば、metJ遺伝子を破壊するか、あるいはプロモーター等のmetJ遺伝子の転写調節配列を改変し、転写が起こらないようにすることによって取得することができる。

【0025】また、本発明の微生物は、微生物の染色体DNA上のmetJ遺伝子を、変異型metJ遺伝子で置換することによっても取得することができる。具体的には、例えば、温度感受性複製起点と変異型metJ遺伝子と薬剤耐性マーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAで微生物を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するmetJ遺伝子との組換えを起こし、染色体上のmetJ遺伝子と変異型metJ遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分(ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なmetJ遺伝子が優性であるので、形質転換株は正常なMetJを発現する。

【0026】次に、染色体DNA上に変異型metJ遺伝子のみを残すために、2個のmetJ遺伝子の組換えにより1コピーのmetJ遺伝子を、ベクター部分(温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なmetJ遺伝子が染色体DNA上に残され、変異型metJ遺伝子が切り出される場合と、反対に変異型metJ遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なmetJ遺伝子が切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。続いて、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、変異型metJ遺伝子が染色体DNA上に残された場合は、正常なmetJ遺伝子を含むプラスミドが細胞から脱落するため、L-メチオニン生産能を示すが、正常なmetJ遺伝子が染色体DNA上に残された場合はL-メチオニン生産能を示さない。したがって、この形質によって、染色体DNA上のmetJ遺伝子が変異型metJ遺伝子で置換された株を得ることができる。

【0027】変異型metJ遺伝子を導入する宿主微生物としては、L-メチオニン生成系がエシェリヒア・コリと同様の抑制を受けるものであれば特に制限されないが、具体的にはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属

細菌、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム等の  
コリネ型細菌等が挙げられる。

【0028】変異型metJ遺伝子を導入するためのベクタ

pAM 330	特開昭58-67699号公報参照
pHM 1519	特開昭58-77895号公報参照
pAJ 655	特開昭58-192900号公報参照
pAJ 611	同上
pAJ 1844	同上
pCG 1	特開昭57-134500号公報参照
pCG 2	特開昭58-35197号公報参照
pCG 4	特開昭57-183799号公報参照
pCG 11	同上
pHK4	特開平5-7491号公報参照

【0029】遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている。

【0030】組換えDNAを微生物に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. et al., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C. H. et al., Gene, 1, 153 (1977))がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. et al., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J. et al., Nature, 274, 398 (1978); Hinne, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法(特開平2-207791号公報参照)によって行うことができる。

【0031】本発明の微生物は、変異型metJ遺伝子を保持することに加えて、L-メチオニン生合成系に関与する酵素の活性が高められていてもよい。L-メチオニン生合成に関与する酵素としては、アスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドナゲナーゼ、ホモセリンドヒドロゲナーゼ、ホモセリントランスサクシニ

ーとしては、エシェリヒア属細菌では前述したプラスミドが、コリネ型細菌では、以下のものが挙げられる。

ラーゼ、シスタチオニナーシンターゼ、 $\beta$ -シスタチオニナーゼ等が挙げられる。

【0032】また、本発明の微生物は、L-メチオニンの生合成経路から分岐してL-メチオニン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下あるいは欠損されていてもよい。そのような酵素としては、ホモセリンキナーゼ、メチオニンアデノシルトランスフェラーゼが挙げられる。

【0033】<5>L-メチオニンの製造

上記のようにして得られるL-メチオニン生産能を有する微生物を培地に培養し、該培地中にL-メチオニンを生産蓄積せしめ、これを該培地から採取することにより、L-メチオニンを製造することができる。

【0034】使用する培地は、微生物に応じて従来より用いられてきた周知の培地を用いてかまわない。つまり、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機成分を含有する通常の培地である。本発明を実施するための特別な培地は必要とされない。

【0035】炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類等を用いることができる。

【0036】窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0037】有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-スレオニン、L-チロシンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることが望ましい。これら他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0038】培養は、利用される微生物に応じて従来より用いられてきた周知の条件で行ってかまわない。例えば、好気的条件下で16~120時間培養を実施するのがよく、培養温度は25℃~45℃に、培養中pHは5~8に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の

酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0039】培養終了後の培地液からのＬ－メチオニンの採取は、本願発明において特別な方法が必要とされることはない。すなわち、本発明は従来より周知となっているイオン交換樹脂法、沈澱法その他の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0040】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0041】＜1＞Ｌ－メチオニンアナログ耐性を有するエシェリヒア・コリ変異株の取得  
Ｌ－メチオニン生産株を得るために、エシェリヒア・コリJM109株を親株として、Ｌ－メチオニンアナログ耐性変異株を作製した。

【0042】LB培地で対数増殖期後期まで培養したエシェリヒア・コリJM109株の細胞を、N－メチル－N’－ニトロ－N－ニトロソグアニジン（NTG）を100mMリン酸緩衝液（pH7.0）に溶解した溶液（0.5mg/ml）で10分間処理した。変異処理した細胞を、1mg/ml、3mg/ml又は5mg/mlのDL－エチオニン又はDL－ノルロイシンを含むM9最少培地プレートに蒔き、37℃で72時間インキュベートした後、形成したコロニーのＬ－メチオニン生産性を調べた。

【0043】Ｌ－メチオニン生産性は、ペディオコッカス・アシディラクティシIFO3076株を用いたマイクロバイオアッセイにより分析した。すなわち、Ｌ－メチオニンアナログ耐性株を最少培地プレートに接種し、コロニーを生育させた後に、メチオニンを含む多数アミノ酸要求性のペディオコッカス・アシディラクティシIFO3076株の培養液を含む軟寒天最少培地を重層し、ハローを形成する位置のアナログ耐性株を選択した。

【0044】その結果、約4500株のエチオニン耐性株から1株、約1000株のノルロイシン耐性株から3株、Ｌ－メチオニン生産能を有する変異株が単離された。

【0045】Ｌ－メチオニン生産が認められた株をLB培地で30℃、24時間培養し、その培養液一白金耳を、500mlフラスコ中の20mlのM1培地（1L中、30gグルコース、2gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10g（NH<sub>4</sub>）<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、10mgMnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O、10mgFeSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O、20gCaCO<sub>3</sub>（別殺菌）を含む。pH7.0（KOHで調整））に接種し、30℃で72時間、120往復／分で振盪培養した。培地中のＬ－メチオニンの量を、アミノ酸アナライザー（日立製作所製、L－8500A）を用いて測定した。結果を表1に示す。

表2

【0046】また、TN1株を0.1%酵母エキスを添加したM1培地で培養した場合、培地中のＬ－メチオニンの蓄積は培養72時間後で最大となり、その量は約1g/Lであった。

【0047】

【表1】

表1

菌 株	アナログ濃度 (mg/ml)	Ｌ－メチオニン 濃度 (mg/ml)
TN1	エチオニン 3	360
5	" 1	350
6	" 3	330
7	ノルロイシン5	320

【0048】＜2＞Ｌ－メチオニン生産株のＬ－メチオニン生合成酵素の活性測定

上記で得られたＬ－メチオニン生産株について、Ｌ－メチオニン生合成系の抑制を調べるために、Ｌ－メチオニン生合成に関与する酵素の活性を測定した。

【0049】エシェリヒア・コリJM109株及びTN1株を、50mlのM9培地又は0.01MのＬ－メチオニンを含むM9培地で、30℃で24時間、対数増殖期後期まで培養した。細胞を、50mM Tris-HCl緩衝液（pH7.5）で洗浄し、2mMジチオスライトールを含む同緩衝液4mlに懸濁した。細胞を超音波破碎し、30,000×gで遠心分離して得た上清を粗酵素液とした。

【0050】上記粗酵素液を用いて、シスタチオニン－α－シンターゼ（CGS）及びシスタチオニン－β－リアーゼ（CBL）の活性を測定した。これらの酵素の発現は、S－アデノシルメチオニンによる抑制を受ける。

【0051】CGS活性はKaplanらの方法（Kaplan, M. et al., J. Biol. Chem., 241,4463-4471 (1966)）により、CBL活性はGuggenheimの方法（Guggenheim, S., Methods in Enzymology, vol. XVII, Academic Press Inc., NY, (1971) p.439-442）により、それぞれ測定した。結果を表2に示す。

【0052】野生株（JM109）では、Ｌ－メチオニンを含む培地ではCGS及びCBLともに活性の低下がみられたのに対し、Ｌ－メチオニン生産株では、Ｌ－メチオニン非存在下で培養したときの活性自体が、野生株に比べて著しく高く、Ｌ－メチオニンによる抑制も解除されていた。

【0053】

【表2】

菌株	L-メチオニン 添加 (0.01M)	CGS (単位/mg)	CBL (単位/mg)
JM109	—	70.3±10.6	14.6±0.2
	+	<2.0	6.6±0.1
TN1	—	461.1±10.5	35.5±0.6
	+	431.0± 9.9	39.3±0.6

#### 【0054】<3>metJ遺伝子の単離

上記<2>で観察された代謝調節の解除は、metJ又はmetKの変異によるものと推定された。そこで、得られたすべてのL-メチオニン生産株から、プロモーター領域及びターミネーター領域を含むmetJ遺伝子をPCR法により単離し、塩基配列を決定した。

【0055】エシェリヒア・コリの野生株及び変異株4株 (TN1、TN5、TN6、TN7) の染色体DNAを鋳型とし、公知のmetJ遺伝子の外側の塩基配列 (Saint-Girons, I. et al., J. Biol. Chem., 259, 14282-14285) に基づいて設計した配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、Ex Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) PCR反応を行った。これらのプライマーは、内部にKpnI部位を有する。PCR反応の条件は、95℃30秒、55℃30秒、72℃1分であり、これを25サイクル行った。

【0056】725bpの単一の増幅断片をKpnI及びXbaIで消化し、pUC19のKpnI及びXbaI部位に連結した。増幅断片の塩基配列をダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法により決定した。Taqポリメラーゼによる読み誤りを防止するために、それぞれの株について独立に3クローン塩基配列を決定した。

【0057】その結果、得られたL-メチオニン生産株のmetJ遺伝子は、プロモーター及びターミネーター領域に変異はみられず、いずれも構造遺伝子の164番目の塩基がGからAに置換されていた。この変異型metJ遺伝子の構造遺伝子の塩基配列を配列番号3に示す。また、この塩基配列によりコードされ得るアミノ酸配列を配列番号3及び4に示す。前記の塩基置換により、55番目 (開始のメチオニン残基を除くと54番目) のアミノ酸残基はセリン残基からアスパラギン残基に置換されていた。

#### 【0058】<4>L-メチオニン生産能に対する変異型metJ遺伝子の効果の確認

上記のように、L-メチオニン生産能を有する変異株

は、metJの変異によりメチオニン生合成系の抑制が解除された結果、L-メチオニン生産能を有することが示唆された。しかし、この形質は、metKの変異によるものである可能性も考えられたので、metJの変異によるものであることを確認した。

【0059】metJ遺伝子産物であるMetJタンパク質はリプレッサーとして機能するため、野生型と変異型とでは野生型が優性に作用する。したがって、L-メチオニン生産能がmetJ遺伝子の変異によるものであれば、L-メチオニン生産株に野生型metJ遺伝子を導入すれば、元の野生株の性質が戻ると予想される。

【0060】前記の変異型metJ遺伝子と同様にして、エシェリヒア・コリJM109株から野生型metJ遺伝子を単離した。野生型metJ遺伝子を含むプラスミドは、さらにEcoRI及びHindIIIで消化して小断片を回収し、EcoRI及びHindIIIで消化したpBR322の大断片に連結し、低コピー数のプラスミドpWJMを得た。このプラスミドpWJMでTN1株を形質転換した。

【0061】得られた形質転換株、エシェリヒア・コリJM109、及びTN1株を、L-メチオニン存在下又は非存在下で培養し、前記と同様にして粗酵素液を調製し、CGS及びCBLの活性を測定した。結果を図1に示す。その結果、CGS及びCBLは、野生型metJ遺伝子を導入したTN1株では野生株と同程度に抑制を受けたのに対し、TN1株ではL-メチオニン存在下でも野生株に比べて高い活性を示した。

【0062】TN1株は、エシェリヒア・コリAJ13543と命名され、1998年11月24日付で、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-17060として寄託されている。

#### 【0063】

【発明の効果】本発明により、L-メチオニン生産能を有する微生物、及び同微生物の育種に利用することができる変異型metJ遺伝子が提供される。

#### 【0064】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Ltd)

<120> 変異型metJ遺伝子及びL-メチオニンの製造法 (Mutant metJ gene and Method for Producing L-Methionine)

<130> P-6157

<;141>; 1998-11-24  
 <;160>; 4  
 <;170>; PatentIn Ver. 2.0

【0065】

<;210>; 1  
 <;211>; 27  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence:primer  
 <;400>; 1  
 cggggtacca cgcgtcatgt gatgaag

27

【0066】

<;210>; 2  
 <;211>; 27  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence  
 <;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence:primer  
 <;400>; 2  
 tgctctagat tatccgcct acaagtt

27

【0067】

<;210>; 3  
 <;211>; 318  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Escherichia coli  
 <;220>;  
 <;221>; CDS  
 <;222>; (1)..(315)  
 <;400>; 3

atg gct gaa tgg agc ggc gaa tat atc agc cca tac gct gag cac ggc	48
Met Ala Glu Trp Ser Gly Glu Tyr Ile Ser Pro Tyr Ala Glu His Gly	
1 5 10 15	
aag aag agt gaa caa gtc aaa aag att acg gtt tcc att cct ctt aag	96
Lys Lys Ser Glu Gln Val Lys Lys Ile Thr Val Ser Ile Pro Leu Lys	
20 25 30	
gtg tta aaa atc ctc acc gat gaa cgc acg cgt cgt cag gtg aac aac	144
Val Leu Lys Ile Leu Thr Asp Glu Arg Thr Arg Arg Gln Val Asn Asn	
35 40 45	
ctg cgt cac gct acc aac aac gag ctg ctg tgc gaa gcg ttt ctg cat	192
Leu Arg His Ala Thr Asn Asn Glu Leu Leu Cys Glu Ala Phe Leu His	
50 55 60	
gcc ttt acc ggg caa cct ttg ccg gat gat gcc gat ctg cgt aaa gag	240
Ala Phe Thr Gly Gln Pro Leu Pro Asp Asp Ala Asp Leu Arg Lys Glu	
65 70 75 80	
cgc agc gac gaa atc ccg gaa gcg gca aaa gag atc atg cgt gag atg	288
Arg Ser Asp Glu Ile Pro Glu Ala Ala Lys Glu Ile Met Arg Glu Met	
85 90 95	
ggg att aac ccg gag acg tgg gaa tac taa	318
Gly Ile Asn Pro Glu Thr Trp Glu Tyr	



100

105

【0068】

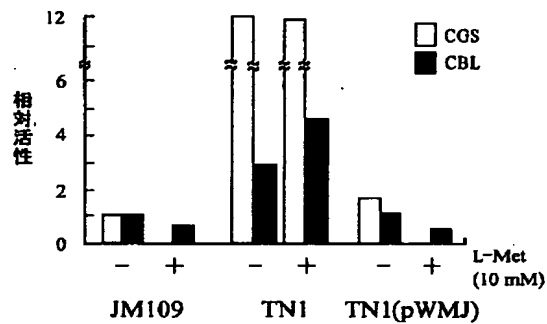
<;210>; 4  
 <;211>; 105  
 <;212>; PRT  
 <;213>; Escherichia coli  
 <;400>; 4  
 Met Ala Glu Trp Ser Gly Glu Tyr Ile Ser Pro Tyr Ala Glu His Gly  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Ser Glu Gln Val Lys Lys Ile Thr Val Ser Ile Pro Leu Lys  
 20 25 30  
 Val Leu Lys Ile Leu Thr Asp Glu Arg Thr Arg Arg Gln Val Asn Asn  
 35 40 45  
 Leu Arg His Ala Thr Asn Asn Glu Leu Leu Cys Glu Ala Phe Leu His  
 50 55 60  
 Ala Phe Thr Gly Gln Pro Leu Pro Asp Asp Ala Asp Leu Arg Lys Glu  
 65 70 75 80  
 Arg Ser Asp Glu Ile Pro Glu Ala Ala Lys Glu Ile Met Arg Glu Met  
 85 90 95  
 Gly Ile Asn Pro Glu Thr Trp Glu Tyr  
 100 105

【図面の簡単な説明】

【図1】 L-メチオニン存在下又は非存在下で培養したエシェリヒア・コリJM109、TN1株、及び野生型met

J遺伝子を導入したTN1株の粗酵素液のシスタチオニン-γ-シンターゼ（CGS）及びシスタチオニン-β-リアーゼ（CBL）の相対活性を示す図。

【図1】



**VARIATION TYPE metJ GENE AND PRODUCTION OF L-METHIONINE**

**Patent number:** JP2000157267  
**Publication date:** 2000-06-13  
**Inventor:** NAKAMORI SHIGERU; TAKAGI HIROSHI  
**Applicant:** AJINOMOTO CO INC  
**Classification:**  
**- international:** C12N15/00; C12N1/21; C12P13/12  
**- european:**  
**Application number:** JP19980333131 19981124  
**Priority number(s):**

**Abstract of JP2000157267**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new variation type metJ gene having a specific amino acid sequence, lowered in activity in repressing methionine biosynthesis, encoding a L-methionine biosynthesis-relating repressor protein from Escherichia coli and useful for producing L-methionine or the like.

**SOLUTION:** This new variation type metJ gene encodes a L-methionine biosynthesis-relating repressor protein from Escherichia coli and is useful for producing L-methionine by zymotechnics, or the like. The protein is selected from a protein having an amino acid sequence of the formula and having an amino acid residue except serine residue at the 55-th position or a protein having an amino acid sequence including at least one substitution, deletion, insertion, addition or inversion at the other position than the 55-th amino acid residue in the formula, having an amino acid residue except serine residue at the 55-th position in the amino acid sequence of the formula and showing lowered activity in repressing methionine biosynthesis.

```

Met Ala Glu Trp Ser Gly Glu Tyr Ile Ser Pro Tyr Ala Glu His Gly
 1           5           10           15
Lys Lys Ser Gln Gln Val Lys Lys Ile Thr Val Ser Ile Pro Leu Lys
 20           25           30
Val Leu Lys Ile Leu Thr Asp Glu Arg Thr Arg Arg Gln Val Asn Asn
 35           40           45
Leu Arg His Ala Thr Asn Asn Glu Leu Leu Cys Glu Ala Phe Leu His
 50           55           60
Ala Phe Thr Gly Gln Pro Leu Pro Asp Asp Ala Asp Leu Arg Lys Glu
 65           70           75           80
Arg Ser Asp Glu Ile Pro Gln Ala Ala Lys Glu Ile Met Arg Glu Met
 85           90           95
Gly Ile Asn Pro Gln Thr Trp Glu Tyr
 100           105

```

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**